

THESIS

MUNICH

1965

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

*Nachweis der Hautresorption von Heparinoid
am Menschen*

Wolf-Dieter | Zinn

Nachweis der Hautresorption von Heparinoid
am Menschen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolf-Dieter Zinn
aus Regensburg

München 1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Herr Priv.Doiz.Dr.H.Mathies

Mitberichterstatter: Herr Prof.Dr.W.Seitz

Dekan : Herr Prof.Dr.R.Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 19.Oktober 1965

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

Problematik	5
Chemie und Pharmakologie	8
Eigene Untersuchungen	9
Methodik	9
Versuchsreihen	11
Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	12
Diskussion	14
Zusammenfassung	16
Tabellen und Abbildungen	17
Literaturverzeichnis	30

P r o b l e m a t i k

In der vorgelegten Arbeit sollte untersucht werden, ob ein neues Heparinoid (G 31150), das als Salbe mit der Versuchsbezeichnung R 2055 vorliegt, durch die Haut des Menschen resorbiert wird.

Zur Anwendung kam dabei die Methode, mit der **M a t h i e s** ¹⁻¹¹⁾ und Mitarbeiter bereits die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salicylate, des Chlorbenzmethoxazons, des Phenylbutazons, der Glucocorticoide und auch der Moorbäder nachgewiesen haben. Sie konnten feststellen, dass die hyaluronidasehemmende Wirkung dieser Stoffe an eine Aktivierung des Nebennierenmarks mit Ausschüttung von Katecholaminen gebunden zu sein scheint. Auf Grund weiterer Versuchsergebnisse konnten **M a t h i e s** und **S c h e u f e l e** ¹²⁾ bzw. **M a t h i e s** und **S c h l i e r f** ¹³⁾ zeigen, dass beim Zustandekommen der hyaluronidasehemmenden Wirkung kein primärer Effekt des Adrenalins oder des Noradrenalins als Hormone des Nebennierenmarks, vorliegt, sondern dass die Hyaluronidasehemmung immer dann auftritt, wenn das durch Katecholaminausschüttung erhöhte Blutspiegelniveau wieder auf tiefere Werte absinkt. Demnach darf also angenommen werden, dass erst bei einem Abfall eines durch vorherige Ausschüttung aus dem Nebennierenmark erhöhten Katecholaminspiegels auf ein niedrigeres Niveau ein Wirkungsmechanismus in Gang gesetzt wird, der die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität auslöst. Dieser Wirkungsmechanismus, der also durch das Absinken des Katecholaminspiegels einsetzt und der letztlich die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität bedingt, konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden. Es ist wahrscheinlich, dass im Körper vorkommende Substanzen, welche ebenfalls eine hyaluronidasehemmende Wirkung haben, freigesetzt und wirksam werden. Nach Untersuchungen von **G i b b i a n** ¹⁴⁾, **P a n t l i t s c h k o** und **K a i s e r** ¹⁵⁾, sowie von **v a n C a n e g h e m**, **M a r x** und **S p i e r** ¹⁶⁾ wird die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins beschrieben. **M a t h i e s** ¹⁷⁾ vermutet, dass freigesetzte Nebennierenmark-Katecholamine das Heparin aus den Mastzellen mobilisieren. Demzufolge wirkt auch experimentell appliziertes Heparin hyaluronidasehemmend. **M a x e i n** ¹⁸⁾ und **Z i w a r i** ¹⁹⁾ konnten in Tierversuchen die in vitro und in vivo bekannte hyaluronidasehemmende Wirkung

des Heparins bestätigen. Versuche von W e r r e s ²⁰⁾ mit der niedrigsten Heparindosierung, i.v. injiziert, liessen erkennen, dass auch am Menschen noch eine deutliche Hemmung der Hyaluronidaseaktivität festzustellen ist. Dabei ergab sich, dass bei einer Dosis von über 500 I.E. Heparin pro Versuchsperson (= ca. 5 mg) das Ausmass der Hyaluronidasehemmung deutlich ist, während unter 500 I.E. pro Versuchsperson die Hyaluronidasehemmung nur noch schwach erkennbar war. Demnach liegt die geringste Heparindosis, welche noch eine maximale Hyaluronidasehemmung ergibt, unter den Heparinmengen, welche eine Gerinnungsverlängerung des Blutes möglich machen.

Bei den folgenden Versuchen sollte durch Bestimmung der Beeinflussung des Hyaluronidase-Spreadings durch kutane Applikation eines Heparinoids eine etwaige Hautresorption nachgewiesen werden. Dabei war zu untersuchen, in wie weit nach kutaner Applikation der Salbe R 2055 und deren Salbengrundlage eine Hyaluronidasehemmung, d.h. eine Verkleinerung der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel im Vergleich zum Leerwert ohne Salben-Applikation eintritt. Das Enzym Hyaluronidase wirkt nämlich als Ausbreitungsfaktor (spreading factor) in Haut und Bindegewebe, so dass durch die depolymerisierende Wirkung Fremdsubstanzen wie z.B. kolloidale Farbstoffe rascher in die Gewebe eindringen, weil die Kittsubstanz depolymerisiert wird. (21). Der nach der Heparinoid-Salbenapplikation einsetzende, hyaluronidasehemmende Effekt hemmt wiederum die Depolymerisierung der Zell-Kittsubstanz. Somit kann bei einer Hemmung der Farbstoffausbreitung bei der Farbstoff-Hyaluronidasequaddel der eindeutige Beweis einer sicheren Salbenresorption durch die Haut erbracht werden, vorausgesetzt, dass Applikationsort und Mess-Stelle räumlich voneinander getrennt sind.

Zweck der folgenden Untersuchungen war also der Versuch, die mit ähnlicher Methodik von B u r k ²²⁾ bereits an der Ratte nachgewiesene Resorption einer Heparin- und verschiedener Heparinoid-Salben beim Menschen am Beispiel der Heparinoidsalbe R 2055 zu objektivieren. Die Heparinoidwirkung konnte dabei genauso wie in den eben erwähnten Tierversuchen von B u r k ²²⁾ mit Hilfe des hemmenden Einflusses auf die durch Hyaluronidase geförderte Farbstoffausbreitung im

Spreading-Test nachgewiesen werden. Allerdings konnte dabei eine bei der Ratte nachgewiesene Heparinoid-Resorption durch die Haut noch nicht mit einer gleichen Wirkung beim Menschen mit einem anderen Heparinoid gleichgesetzt werden. Überdies war die bei der Ratte applizierte Heparinoidmenge vergleichsweise grösser.

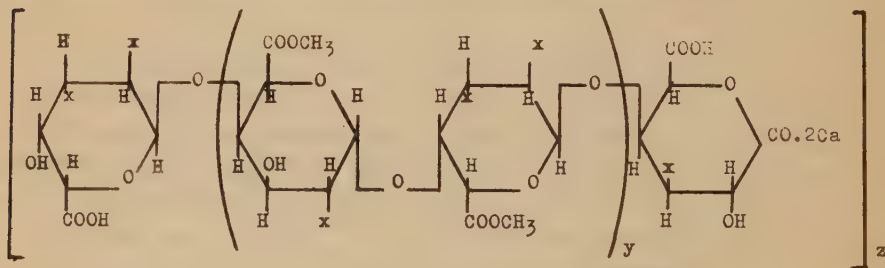
M a t h i e s konnte in unveröffentlichten Vorversuchen am Menschen feststellen, dass eine eindeutige Wirkung von 2,5 g einer 1 % igen Heparinoid-Salbe R 2055 pro Versuchsperson nicht eintrat. Alle Versuchspersonen wiesen dabei eine noch erkennbare Hemmung auf, deren Maximalwerte nur zu verschiedenen Zeiten lagen, sodass die Durchschnittswerte naturgemäss eine geringere Hemmung zeigten, als es den Einzelversuchen entsprach. Trotzdem blieb es offen, ob eine Dosiserhöhung bei Salbenapplikation beim Menschen deutlichere Ergebnisse zeigt. Aus diesem Grunde haben wir versucht, durch Dosiserhöhung eine Hautresorption ausreichender Mengen der Heparinoid-Salbe zu beobachten.

Chemie und Pharmakologie

Heparinoide sind synthetisch gewonnene heparinähnliche Polymerisate, die von dem Antikoagulans Heparin, einem Polysaccharid, das aus Sulfonylaminoglucose und Schwefelsäureestern der Glucuronsäure aufgebaut ist, abzuleiten sind.

Heparinoid G 31 150 ist der Calciumkomplex der Sulfatierungsprodukte oxydativ abgebauter Polygalacturonsäuremethylester mit einem Calciumgehalt von 4,5 % und einem mittleren Molekulargewicht von 40 000. Es enthält 5,4 % Methoxylgruppen und besitzt einen Schwefelgehalt von 13 %. Seine wässrigen Lösungen sind wenig viskos und optisch aktiv. Wie das Heparin zeigt auch das Heparinoid G 31150 eine intensive Beeinflussung der Blutgerinnung in vivo und in vitro. Es bewirkt eine Hemmung der Thrombinwirkung und erhöht die Rekalzifizierungszeit. Um die gleiche Antithrombinwirkung zu erzielen, sind bei G 31 150 etwa fünf mal höhere Konzentrationen erforderlich als beim Heparin. Bei der Wirkung auf die Rekalzifizierungszeit ist der Initialeffekt des Heparinoids geringer als der des Heparins und die Rückkehr zur Norm verlangsamt. Protaminsulfat zeigt einen deutlich antagonistischen Effekt zu G 31 150, die Wirkung von 1 mg Heparinoid kann in vitro durch 0.5 - 1 mg Protaminsulfat aufgehoben werden. Die Toxizität von G 31 150 ist gering, in entsprechend hoher Dosierung führt es zu ausgedehnten Blutungen, die mittlere letale Dosis liegt für Meerschweinchen bei 3 g / kg i.v.. Bei Hunden wurden bei chronischer Belastung Schleimhautulcera beobachtet. Beim Menschen liegt die Toleranzdosis anscheinend höher, zumal 1 200 mg i.v. ohne Nebenwirkungen getragen werden (23) .

Die chemische Formel für das Heparinoid R 2055 lautet:



x = -OSO₂ONa

y = 2 - 4

z = 15 - 25

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

=====

M e t h o d i k

Die folgenden experimentellen Untersuchungen wurden an männlichen und weiblichen Versuchspersonen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 75 kg durchgeführt. An den Versuchsreihen mit der zu untersuchenden 1 % igen Heparinoid-Salbe R 2055 sowie deren Salbengrundlage nahmen je 4 Versuchspersonen teil. Um eine nachteilige Beeinflussung der Versuchsergebnisse zu vermeiden, musste während der Versuchsdauer von 4 Stunden jeder Proband ruhig liegen, ohne dabei etwas zu sich zu nehmen. Als Grundlage der Versuchsreihe diente der sogenannte Spreading-Test. Er lässt eine Messung der Hyaluronidaseaktivität und deren Hemmung zu, indem die Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. einer Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation der zu untersuchenden Substanz planimetrisch bestimmt wird. In vorangegangenen Arbeiten über die Resorption von Heparinoid-Salben im Tierversuch, haben M a t h i e s und Mitarbeiter als geeigneten Farbstoff die 0,06 %ige Evansblue-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung beschrieben. Da dieser Farbstoff zu lange in der Bauchhaut eines Menschen verbleiben würde, (24) suchten wir nach einem geeigneteren Farbstoff, welcher nach mindestens 4 Tagen vollständig aus der Bauchhaut resorbiert wurde. Somit wurde als Farbstofflösung eine 0,1 % ige Patentblau-VF-Lösung in physiolog. NaCl-Lösung verwendet, mit der allerdings qualitativ schlechter zu markierende Farbflecken erzielt wurden. Zur Herstellung der Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung wurde in 2 ccm der genannten Patentblau-VF-Lösung eine Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin), 150 I.E. enthaltend, gelöst. Bei der späteren Injektion von 0,1 ccm Farbstoff + Hyaluronidase-Lösung kamen also jeweils 7,5 I.E. zur Wirkung. Neben den Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddeln wurden zu Vergleichszwecken bei allen Versuchen Farbstoff-Quaddeln mit 0,1 ccm der gleichen Farbstofflösung, jedoch ohne Kinetin-Zusatz gesetzt. Für die Untersuchungen eignete sich wegen der etwa gleichmässigen Gewebsbeschaffenheit und der Grossflächigkeit am besten die Bauchhaut im Bereich des Hypogastriums. Während B u r k ²²⁾ in früheren Tierversuchen die Möglichkeit einer direkten Diffusion der Salbe von der Brusthaut in

die Bauchhaut dadurch vermeiden konnte, dass er bei den Ratten die Haut am unteren Thoraxrand durchtrennte, konnte auf die Vermeidung dieser geringfügigen Fehlerquelle der Versuchsergebnisse beim Menschen verständlicherweise keine Rücksicht genommen werden. Somit konnten auf der Bauchhaut, vom Nabel bis in die Leistengegend, gut 9 Quaddelpaare angeordnet werden. Die Vergleichsquaddel mit reinem Farbstoff wurde zweckmässig neben die zur gleichen Zeit gesetzten Quaddel mit Farbstoff + Hyaluronidase angebracht. Dabei wurden für jede Quaddel 0,1 ccm der entsprechenden Lösungen verwendet, welche mit Tuberkulinspritzen und dünnen Kanülen (Nr.20) streng intrakutan injiziert wurden. Konnte man annehmen, dass eine Injektion nicht streng intrakutan lag, so wurde in unmittelbarer Nähe eine Ersatzquaddel gesetzt. Die Ausbreitungen des ersten Quaddelpaares in einem Leerversuch vor der Salbenapplikation wurden nach 10 Minuten registriert, da nach Medina veitia²⁵⁾ das Hyaluronidase-Spreading zweiphasig verläuft und nur in den ersten 10 Minuten die ablaufende Reaktion sicher einen echten Effekt der Hyaluronidase gibt. Nach Gibian²⁶⁾ beruht die durch die Hyaluronidase verstärkte aktive Diffusion einer intrakutan gesetzten Quaddel auf dem Druck, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Nach Ablauf der ersten 10 Minuten dürften sich hauptsächlich nur noch Resorptionsmechanismen abspielen.

Technisch stellt man die Quaddelgrösse fest, indem man die Konturen der Quaddel auf der Bauchhaut mit einem Tintenstift punktiert und die so festgelegten Grenzen auf einen durchsichtigen Zelluloidstreifen überträgt. Mit Hilfe eines Planimeters wird der Flächeninhalt bestimmt, da die Flächengrösse als Mass für die Hyaluronidaseaktivität dient, wie bereits oben erwähnt wurde. Nachdem die Quaddelgrössen des Leerversuchs, welcher über die Hyaluronidaseaktivität ohne Einwirkung hemmender Substanzen orientieren soll, bestimmt waren, wurden den Versuchspersonen je 30 g Heparinoid-Salbe 1% iger Konzentration appliziert. Die Applikation am liegenden Probanden erfolgte auf der Brust- und seitlichen Thoraxhaut, sowie an der Streckseite der oberen und unteren Extremitäten. In Zeiträumen von jeweils 30 Minuten nach Applikation der Prüfsubstanzen wurden wie im beschriebenen Leerversuch je eine Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel und eine Farbstoff-Quaddel intrakutan in die Bauchhaut der Versuchspersonen gesetzt und die jeweils nach 10 Minuten erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken wieder

festgestellt und planimetriert. Die Hemmung wurde geprüft bei 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 Minuten nach Auftragen der Salbe.

Normalerweise breitet sich die Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel viel rascher und weiter aus, als die reine Farbstoff-Quaddel. Wird dagegen eine hyaluronidasehemmende Substanz, in unserem Falle die Heparinoid-Salbe, wirksam, so weist - wie bereits oben erwähnt - die Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel eine gewisse Hemmung auf.

Eine analoge Versuchsreihe wurde mit dem Placebo dieser 1 % igen Heparinoid-Salbe anschliessend durchgeführt.

V e r s u c h s r e i h e n

1. Versuchsreihe:

Nach oben beschriebener Methodik wurde eine mögliche Resorption durch die Haut der 1 % igen Heparinoid-Salbe R 2055 untersucht und geprüft, zu welchem Zeitpunkt die Hyaluronidasehemmung des applizierten Heparinoids ihren maximalen Wirkungsgrad erreicht hat.

Salbentyp: Öl-in-Wasser-Emulsion.

Bei allen 4 Probanden wurden Quaddelpaare nach jeweils 30 Minuten p.a. gesetzt. Wie aus den Mittelwerten der Tabelle 2) hervorgeht, steigt der hyaluronidasehemmende Effekt des Präparates R 2055 fortlaufend an, erreicht nach 210 Minuten seinen Maximalwert und fällt dann rapid wieder ab. Jedoch ist nach 240 Minuten noch eine Hemmung sichtbar.

2. Versuchsreihe:

Bei gleicher Methodik wurde das Placebo der 1 % igen Heparinoidsalbe R 2055 verwendet. Auch hier wurde, ebenso wie im Versuch 1) die Hyaluronidaseaktivität nach denselben Zeiten bestimmt. Wie aus den Mittelwerten der Tabelle 4) ersichtlich wird, bestehen geringe Differenzen der gemessenen Werte nach der Applikation gegenüber dem Leerversuch. Ein ganz geringer hyaluronidasehemmender Effekt ist registrierbar, der seinen Maximalwert nach 120 Minuten erreicht und dann langsam wieder abfällt.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

=====

In Tabelle 5) sind die beobachteten arithmetischen Mittel der beiden Quaddel-Typen in den beiden Versuchsreihen einschliesslich ihrer 95 % - Konfidenzbereiche angegeben. Die eigentliche statistische Auswertung erfolgte innerhalb der beiden Versuchsreihen jeweils durch 2-fache Varianz-Analysen, wobei zunächst das Verhalten der reinen Farbstoff-Quaddel und dasjenige der Farbstoff + Hyase-Quaddel getrennt betrachtet wurde. Zur Prüfung der Frage, zu welchen Zeitpunkten nach Applikation der Substanz speziell eine Hemmung im Spreading der Quaddeln gegenüber dem Leerwert vorlag, wurde im Anschluss an die Varianz-Analysen ein mehrfacher Vergleich nach Tukey durchgeführt. Schliesslich wurde in einer mehrfachen Varianz-Analyse das Verhalten der reinen Farbstoff-Quaddel und dasjenige der Farbstoff + Hyase-Quaddel innerhalb der gleichen Versuchsreihe miteinander verglichen.

Die zweifachen Varianz-Analysen zur Prüfung der Hemmung des Spreadings der reinen Farbstoff-Quaddel bzw. der Farbstoff + Hyase-Quaddel nach Applikation von R 2055 sind in Tabelle 6) angegeben. Hiernach zeigt sich sowohl für die reine Farbstoff-Quaddel als auch für die Farbstoff + Hyase-Quaddel eine statistisch hoch gesicherte Veränderung im Spreading während des Versuchsablaufes (Irrtumswahrscheinlich maximal 0, 1 %). Das Ergebnis des mehrfachen Vergleiches ist für die reine Farbstoff-Quaddel in Tabelle 7), für die Farbstoff + Hyase-Quaddel in Tabelle 8) angegeben. In diesen Tabellen ist für je 2 Versuchszeiten die zwischen ihnen beobachtete Abweichung im mittleren Spreading des jeweiligen Quaddel-Typs angegeben. Diejenigen Werte, die statistisch gesichert von Null verschieden sind, sind durch Unterstreichungen gekennzeichnet (--: Irrtumswahrscheinlichkeit maximal 5 %; ---: Irrtumswahrscheinlichkeit maximal 1 %). Für die reine Farbstoff-Quaddel liegt hiernach für alle Zeitpunkte zwischen 90 Minuten und 210 Minuten eine statistisch gesicherte Hemmung im Spreading gegenüber dem Leerversuch vor. Das gleiche Ergebnis trifft auch für das Verhalten der Farbstoff + Hyase-Quaddel zu.

Der Vergleich des Verhaltens der beiden Quaddel-Typen ist in der Varianz-Analyse der Tabelle 9) durchgeführt. Die Varianz-Komponente " Zeiten x Verfahren " dieser Varianz-Analyse zeigt, dass sich das zeitliche Verhalten der beiden Quaddel-Typen in statistisch gesicher-

ter Weise unterscheidet (Irrtumswahrscheinlichkeit maximal 1,0 %). Die beobachteten Unterschiede in der Hemmung des Spreadings zwischen den beiden Quaddel-Typen sind somit statistisch gesichert.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Versuche mit der Placebo-Salbe sind in entsprechender Weise in den Tabellen 10) bis 13) zusammengestellt. Hiernach liegt für die beiden Quaddeltypen eine statistisch schwach gesicherte Veränderung ihres Spreadings im Versuchsablauf vor; es handelt sich hierbei um eine statistisch schwach gesicherte Hemmung zum Zeitpunkt 120 Minuten gegenüber den Leer-Quaddeln. Zwischen den beiden Quaddel-Typen lassen sich hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes des Spreadings keine statistisch fassbaren Unterschiede feststellen (siehe Tabelle 13), Varianz-Komponente " Zeiten x Verfahren ").

Zusammenfassend ergibt die statistische Auswertung, dass durch Applikation der Heparinoid-Salbe R 2055 eine statistisch gesicherte Hemmung im Spreading einer Hyaluronidase-Quaddel erzielt werden kann. Das beobachtete Maximum dieser Hemmung tritt zum Zeitpunkt 240 Minuten nach Applikation der Salbe auf, bis zu diesem Zeitpunkt zeigt sich eine stetige Zunahme in der Hemmung, die praktisch linear ist. Nach dem Zeitpunkt 240 Minuten nimmt die Hemmung im Spreading der Farbstoff + Hyase-Quaddel in statistisch gesicherter Weise stark ab. Das Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel wird in ähnlicher Weise beeinflusst, wie dasjenige der Farbstoff + Hyase-Quaddel, allerdings liegt zwischen den beiden Quaddel-Typen hinsichtlich der Stärke des Effektes ein statistisch gesicherter Unterschied vor.

Die nach Applikation der Heparinoid-Salbe R 2055 beobachteten Veränderungen im Spreading der beiden Quaddel-Typen unterscheiden sich in ihrer Grösse deutlich von denjenigen Veränderungen, die nach Applikation der Salbengrundlage allein beobachtet werden konnten.

Der zeitliche Ablauf in der Hemmung des Spreadings der beiden Quaddel-Typen ist für die beiden Versuchsreihen in den Abbildungen 5) und 6) dargestellt.

D i s k u s s i o n

Mit der oben beschriebenen Versuchsanordnung wurde nachgewiesen, dass nach Applikation von 30 g der getesteten 1 % igen Heparinoid-salbe mit der Versuchsbezeichnung R 2055 eine deutliche Hemmung der Ausbreitung des durch Hyaluronidase gesteigerten Farbstoff-Sprea-dings beim Menschen auftrat. Nachdem M a t h i e s in unveröffent-lichten Vorversuchen am Menschen bei der Applikation von 2,5 g / Ver-suchsperson des gleichen Salbentyps keine eindeutige Wirkung feststel-len konnte, wurde in der vorgelegten Arbeit die Dosis erhöht. Durch diese Dosiserhöhung von 2,5 g/Versuchsperson auf 30 g/Versuchsperson, d.i. 4 mg/kg Versuchsperson und einer zeitlichen Verlängerung der Versuchsdauer von 60 Minuten auf insgesamt 240 Minuten konnten weit bessere Werte erstellt werden, welche eine hemmende Wirkung auf das Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading sicherten.

B u r k ²²⁾ konnte in seinen Tierversuchen eine mögliche intraku-tane Ausbreitung der zu untersuchenden Salbe ausschalten durch seine Feststellung, dass auch bei Durchtrennung der Haut zwischen Mess- und Applikationsstelle der hyaluronidasehemmende Effekt auf-trat. Bei unseren Untersuchungen ist eine Resorption bei räumlicher Differenz von Mess- und Applikationsstelle wahrscheinlich, auch wenn die operative Trennung nicht wie beim Tier möglich ist. Demnach kann mit einer Allgemeinwirkung nach Resorption gerechnet werden. Im Gegen-satz zu den Tierversuchen zeigen die Versuche mit der Salbe R 2055 beim Menschen keine so deutliche Hemmung. Die Ursache dafür liegt möglicherweise bei unserer Versuchsanordnung in der Verwendung eines anderen Farbstoffes. Da Evansblue eine monatelange Verweildauer in der Haut hat und deshalb beim Menschen nicht anwendbar ist, mussten wir eine Patentblau-VF-Lösung verwenden, welche weniger deutliche Differenzen zwischen Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel ergab, wodurch auch die Hemmwerte der Hyaluronidasewirkung nicht in der gleichen Größenordnung wie beim Tierversuch liegen können.

Ein sicherer Vergleich zwischen Tier- und Menschversuchen ist nicht zulässig, da einerseits die in den Menschenversuchen kutan applizier-ten Wirkstoffmengen vergleichsweise weitaus geringer sind als in den Rattenversuchen, andererseits aber auch die beim Menschen wirksamen Dosen geringer als bei der Ratte sind.

Durch die Bestimmung der Beeinflussung der Hyaluronidaseaktivität konnte die umstrittene Resorptionsmöglichkeit des Heparinoids bestätigt werden. Jedoch ist nicht damit erwiesen, dass ein Heparin-Abkömmling in so grossen Mengen resorbiert wird, welche die Blutgerinnung wesentlich beeinflussen.

Gerinnungsphysiologische Untersuchungen mit Hilfe des Thrombelastogramms nach Hartert führten zu dem Ergebnis, dass nach i.v. Applikation von 400 mg G 31150, welches bei unseren Versuchen als Salbe mit der Versuchsbezeichnung R 2055 vorlag, eine Gerinnungshemmung erreicht wird, wie sie nach einer Initialdosis zur Behandlung thrombotischer Erkrankungen gefordert wird (27). Die bei uns verwendeten Salbenmengen von 4 mg G 31150 / kg sind zu gering, um einen Einfluss auf die Blutgerinnung zu erwarten.

Über die resorbierte Menge unserer Versuchssubstanz ist keine Aussage zu machen. Im Vergleich mit bereits vorliegenden Untersuchungen an der Ratte, die mit einem ähnlichen Heparinoid durchgeführt wurden (Maxe in¹⁸⁾, Meder²⁸⁾, Terhardt²⁹⁾) ist bei Gaben von 0,15 - 0,2 mg/kg noch eine sichere Hemmung des Spreadings erreicht. Ziwar i¹⁹⁾, der ähnliche Untersuchungen mit 1,5 mg Heparin / kg durchführte, konnte feststellen, dass eine weitere Steigerung der Dosis keine grösseren Hemmwerte der Hyaluronidaseaktivität auftreten liess. Verglichen mit der von Weres²⁰⁾ beim Menschen applizierten und noch hyaluronidasehemmend wirksamen Menge von 0,33 mg Heparin / kg wird die von uns kutan applizierte Menge von 4 mg Heparinoid / kg annähernd vollständig resorbiert, vorausgesetzt, dass man eine Wirkungsgleichheit von Heparin und G 31150 annehmen kann. Dass wesentliche Dosisunterschiede zwischen Heparin und den verschiedenen Heparinoiden nicht vorliegen, geht aus Untersuchungen Terhardt²⁹⁾ hervor, der im Tierversuch Heparin mit Thrombocid und Eleparon verglich und keine wesentlichen Dosisunterschiede bezüglich der hyaluronidasehemmenden Wirkung fand.

Auch die reine Farbstoff-Quaddel zeigte eine gewisse Beeinflussung durch die Versuchssubstanz R 2055. Bei Vergleichen der reinen Farbstoff-Quaddeln und der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddeln konnte jedoch ein statistisch fassbarer Unterschied festgestellt werden. Die Einwirkung der Versuchssubstanz R 2055 auf die reine Farbstoff-Quaddel ohne Hyaluronidasebeigabe muss so gedeutet werden, dass das Heparinoid

auf die Gewebshyaluronidase einwirkt, oder es handelt sich um einen hyaluronidaseunabhängigen permeabilitätshemmenden Effekt, der im übrigen auch durch die Salbengrundlage allein in schwach statistisch zu sichernder Weise sichtbar wird.

Die im Parallelversuch geprüfte Einwirkung auf die Hyaluronidase einer Placebo-Salbe, die der Salbengrundlage der 1 % igen Heparinoid-Salbe R 2055 entsprach, sichert die Wirkung der Prüfsubstanz selbst gegenüber Einflüssen der Versuchsmanipulation und zeigt die Fehlerbreite der Methodik. Wie wir der Tabelle 3) entnehmen, liegen sowohl für die reine Farbstoff-Quaddel als auch für die Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel äusserst schwach gesicherte Veränderungen ihres Spreadings im Versuchsablauf vor.

Z u s a m m e n f a s s u n g =====

Mit Hilfe eines Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Testes konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine dem Heparin ähnliche Substanz, ein neues Heparinoid (G 31150), welches als Salbe mit der Versuchsbezeichnung R 2055 vorlag, durch die Haut des Menschen resorbiert werden kann.

Die vermutliche Quantität des resorbierten Wirkstoffes wurde an Hand vorliegender Vergleichsuntersuchungen diskutiert.

T a b e l l e n u n d A b b i l d u n g e n
=====

Hyaluronidase-Hemmung durch Heparinoid-Salbe (R 2055) und deren Salbengrundlage (Placebo R 2055) am Menschen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 75 kg.

Applikation von 30 g Salbe / 75 kg Versuchsperson
 = 0,4 g Salbe / kg Versuchsperson

Zeichenerklärung zu den Tabellen:

N : Anzahl der Versuchspersonen
Zeit-t : verstrichene Zeit in Minuten nach Salben-Applikation
L : Leerversuch vor Auftragen der Salben
F : Farbstoffquaddel o h n e Hyaluronidase
F H : Farbstoffquaddel m i t Hyaluronidase
x : Einzelmesswerte der F-Quaddel und der F H - Quaddel
 $\bar{x}$: arithmetisches Mittel beider Quaddeltypen aus Einzelmesswerten zu gleichen Zeiten
Diff.-D : Differenz gegenüber dem Ausgangswert im Leerversuch

Tabellen:

R2055	Person 1				Person 2				Person 3				Person 4			
	F		F H		F		F H		F		F H		F		F H	
t	x	D	x	D	x	D	x	D	x	D	x	D	x	D	x	D
	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$
L	115		125		116		125		132		149		110		130	
30'	112	- 3	125	+0	115	- 1	125	+ 0	128	- 4	139	-10	108	- 2	115	-15
60'	99	-16	108	-17	104	-12	115	-10	130	- 2	130	-19	107	- 3	115	-15
90'	99	-16	109	-16	102	-14	110	-15	125	- 7	114	-35	105	- 5	115	-15
120'	99	-16	103	-22	105	- 9	104	-21	120	-12	110	-39	101	- 9	119	-11
150'	96	-19	106	-19	104	-12	100	-25	115	-17	110	-39	103	- 7	110	-20
180'	100	-15	94	-31	100	-16	102	-23	113	-19	100	-49	104	- 6	105	-25
210'	98	-17	105	-20	98	-18	96	-29	110	-22	90	-59	102	- 8	105	-25
240'	105	-10	110	-15	110	- 6	120	- 5	118	-14	112	-37	108	- 2	130	+ 0

Tabelle 1): Einzelwerte der Versuchsreihe 1 (Heparinoid-Salbe R 2055)

R 2055		F		F H	
N	Zeit	$\bar{x}$	Diff	$\bar{x}$	Diff
		$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$	$\frac{mm}{2}$
4	L	118		133	
	30'	116	-2	126	-7
	60'	110	-8	120	-13
	90'	103	-15	115	-18
	120'	106	-12	109	-24
	150'	105	-13	107	-26
	180'	104	-14	100	-33
	210'	102	-16	99	-34
	240'	110	-8	115	-18

Tabelle 2): Mittelwerte der Versuchsreihe 1 (Heparinoid-Salbe R 2055)

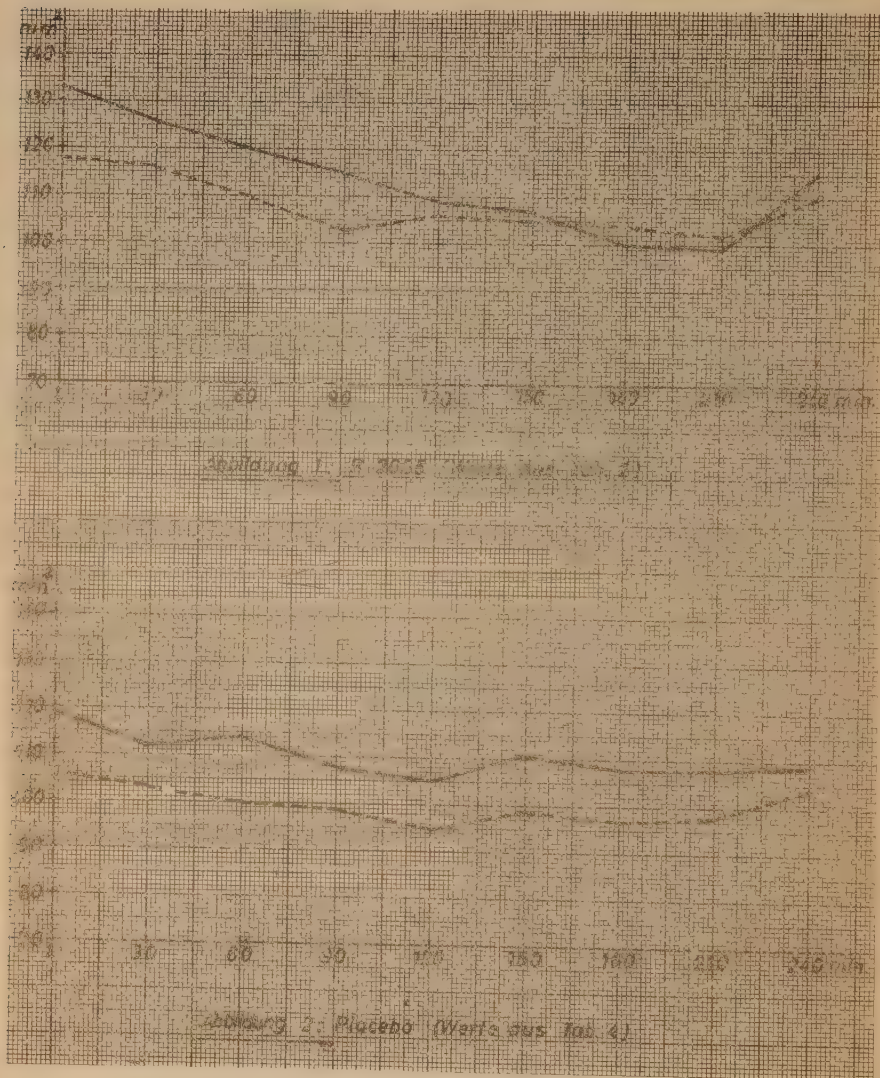
Pla- cebo	Person 1				Person 2				Person 3				Person 4			
	F		F H		F		F H		F		F H		F		F H	
t	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$	x $\frac{\text{mm}^2}{2}$	D $\frac{\text{mm}^2}{2}$
L	113		125		100		110		100		115		109		124	
30'	110	- 3	118	- 7	99	- 1	109	- 1	100	+ 0	105	-10	101	- 8	114	-10
60'	112	- 1	118	- 7	95	- 5	105	- 5	96	- 4	110	- 5	97	-12	120	- 4
90'	110	- 3	110	-15	90	-10	110	+ 0	93	- 7	99	-16	103	- 6	114	-10
120'	108	- 5	110	-15	90	-10	106	- 4	93	- 7	105	-10	89	-20	100	-24
150'	105	- 8	109	-16	98	- 2	104	- 6	99	- 1	110	- 5	92	-17	120	- 4
180'	102	-11	105	-20	94	- 6	112	+ 2	90	-10	99	-16	100	- 9	115	- 9
210'	100	-13	103	-22	96	- 4	106	- 4	96	- 4	105	-10	100	- 9	119	- 5
240'	110	- 3	110	-15	99	- 1	108	- 2	98	- 2	105	-10	107	- 2	120	- 4

Tabelle 3): Einzelwerte der Versuchsreihe 2 (Placebo)

Placebo		F		F H	
N	Zeit	$\bar{x}$ $\frac{\text{mm}^2}{2}$	Diff. $\frac{\text{mm}^2}{2}$	$\bar{x}$ $\frac{\text{mm}^2}{2}$	Diff. $\frac{\text{mm}^2}{2}$
4	L	106		119	
	30'	103	- 3	112	- 7
	60'	100	- 6	114	- 5
	90'	99	- 7	108	-11
	120'	95	-11	105	-14
	150'	99	- 7	111	- 8
	180'	97	- 9	108	-11
	210'	98	- 8	108	-11
	240'	104	- 2	109	-10

Tabelle 4): Mittelwerte der Versuchsreihe 2 (Placebo)

In den folgenden Abbildungen 1 und 2 sind die Mittelwerte der beiden Versuchsreihen aufgetragen, die in den Tabellen 2 und 4 aufgeführt sind.



————— Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel
 - - - - - reine Farbstoff-Quaddel

Arithmetische Mittel und 95% - Konfidenzbereiche

	<u>R 2055</u>		<u>Placebo</u>	
	F	F H	F	F H
IV	118 $\pm$ 3'8	132 $\pm$ 7'5	106 $\pm$ 3'9	119 $\pm$ 5'2
30'	116 $\pm$ 3'8	126 $\pm$ 7'5	103 $\pm$ 3'9	112 $\pm$ 5'2
60'	110 $\pm$ 3'8	117 $\pm$ 7'5	100 $\pm$ 3'9	113 $\pm$ 5'2
90'	108 $\pm$ 3'8	112 $\pm$ 7'5	99 $\pm$ 3'9	108 $\pm$ 5'2
120'	106 $\pm$ 3'8	109 $\pm$ 7'5	95 $\pm$ 3'9	105 $\pm$ 5'2
150'	105 $\pm$ 3'8	107 $\pm$ 7'5	99 $\pm$ 3'9	111 $\pm$ 5'2
180'	104 $\pm$ 3'8	100 $\pm$ 7'5	97 $\pm$ 3'9	108 $\pm$ 5'2
210'	102 $\pm$ 3'8	99 $\pm$ 7'5	98 $\pm$ 3'9	108 $\pm$ 5'2
240'	110 $\pm$ 3'8	118 $\pm$ 7'5	104 $\pm$ 3'9	110 $\pm$ 5'2

Tabelle 5)

Varianzanalysen zur Hemmung des Spreadings der Heparinoidsalbe R 2055

reine Farbstoff - Quaddel

Zwischen Patienten	3	1.918'44	639'48	48'41	0'1 %
Zwischen Zeiten	8	936'72	117'09	8'86	0'1 %
Rest-Varianz	24	317'06	13'21		

Gesamt - Varianz 35 3.172'22 90'63

$$s = 3'6347$$

$$s_x = 1'8173$$

Farbstoff + Hyase - Quaddel

Zwischen Patienten	3	387'33	129'11	2'42	-
Zwischen Zeiten	8	3.989'50	498'68	9'33	0'1 %
Rest-Varianz	24	1.283'17	53'47		

Gesamt - Varianz 35 5.660'00 161'71

$$s = 7'3120$$

$$s_x = 3'6560$$

Tabelle 6)

Matrix der Mittelwertsdifferenzen gegenüber dem Ausgangswert
beider Quaddel-Typen der Versuchssubstanz R 2055

reine Farbstoff - Quaddel								
LV	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
LV	-2	-8	<u>-10</u>	<u>-12</u>	<u>-13</u>	<u>-14</u>	<u>-16</u>	-8
30'		-6	- 8	<u>-10</u>	<u>-11</u>	<u>-12</u>	<u>-14</u>	-6
60'			- 2	- 4	- 5	- 6	- 8	0
90'				- 2	- 3	- 4	- 6	2
120'					- 1	- 2	- 4	4
150'						- 1	- 3	5
180'							- 2	6
210'								8
240'								

minimale gesicherte Mittelwertsdifferenz : 9 bei 5 %
 11 bei 1 %

Tabelle 7)

Farbstoff + Hyase - Quaddel								
LV	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
LV	-6	-15	<u>-20</u>	<u>-23</u>	<u>-25</u>	<u>-32</u>	<u>-33</u>	-14
30'		- 9	-14	-17	<u>-19</u>	<u>-26</u>	<u>-27</u>	- 8
60'			- 5	- 8	-10	-17	<u>-18</u>	1
90'				- 3	- 5	-12	-13	6
120'					- 2	- 9	-10	9
150'						- 7	- 8	11
180'							- 1	<u>18</u>
210'								<u>19</u>
240'								

minimale gesicherte Mittelwertsdifferenz : 18 bei 5 %
 21 bei 1 %

Tabelle 8)

Varianzanalyse zum Vergleich zwischen Quaddel - Typen F und F H
der Versuchssubstanz R 2055

	n	SAQ	MAQ	Femp	p
Zwischen Patienten	3	1.775'00	591'67	28'76	0'1 %
Zwischen Zeiten	8	4.370'28	546'29	26'56	0'1 %
Zwischen Verfahren	1	373'56	373'56	18'16	0'1 %
Patienten x Zeiten	24	1.106'50	46'10	2'24	5'0 %
Patienten x Verfahren	3	530'77	176'92	8'60	0'1 %
Zeiten x Verfahren	8	555'94	69'49	3'38	1'0 %
Rest - Varianz	24	493'73	20'57		
Gesamt - Varianz	71	9.205'78	129'66		

Tabelle 9)

Varianzanalyse zur Hemmung des Spreadings beim Placebo
der Versuchssubstanz R 2055

reine Farbstoff - Quaddel

Zwischen Patienten	3	849'00	293'00	20'21	0'1 %
Zwischen Zeiten	8	372'00	46'50	3'32	5'0 %
Rest - Varianz	24	336'00	14'00		

Gesamt - Varianz 35 1.557'00 44'49

$$s = 3'7417$$

$$s_{\bar{x}} = 1'8708$$

Farbstoff + Hyase - Quaddel

Zwischen Patienten	3	620'89	206'96	8'19	0'1 %
Zwischen Zeiten	8	474'50	59'31	2'35	5'0 %
Rest - Varianz	24	606'61	25'28		

Gesamt - Varianz 35 1.702'00 47'28

$$s = 5'0275$$

$$s_{\bar{x}} = 2'5137$$

Tabelle 10)

Matrix der Mittelwertsdifferenzen gegenüber dem Ausgangswert
beider Quaddel - Typen des Placebo der R 2055

reine Farbstoff - Quaddel

LV	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
LV	-3	-6	-7	<u>-11</u>	-7	<u>-9</u>	-8	-2
30'		-3	-4	-8	-4	-6	-5	1
60'			-1	-5	-1	-3	-2	4
90'				-4	0	-2	-1	5
120'					4	2	3	<u>-2</u>
150'						-2	-1	5
180'							1	7
210'								6
240'								

minimale gesicherte Mittelwertsdifferenz : 9 bei 5 %
 11 bei 1 %

Tabelle 11)

Farbstoff + Hyase - Quaddel

LV	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
LV	-7	-6	-11	<u>-14</u>	-8	-11	-11	-9
30'		1	-4	-7	-1	-4	-4	-2
60'			-5	-8	-2	-5	-5	-3
90'				-3	3	0	0	2
120'					6	3	3	5
150'						-3	-3	-1
180'							0	2
210'								2
240'								

minimale gesicherte Mittelwertsdifferenz : 12 bei 5 %
 15 bei 1 %

Tabelle 12)

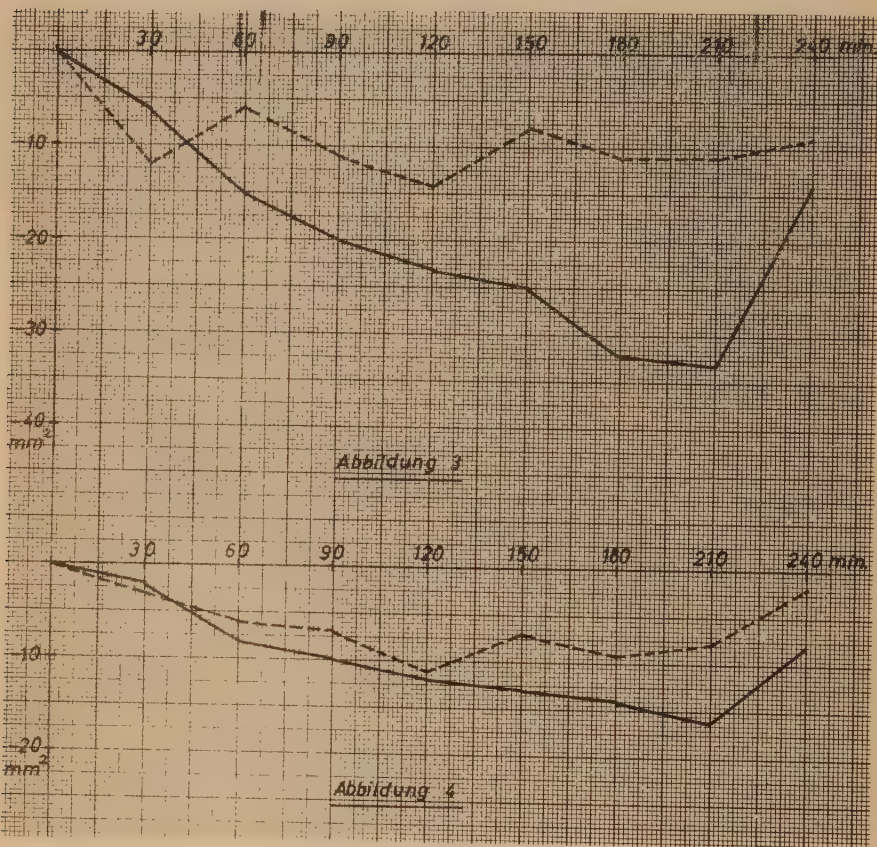
Varianzanalyse zum Vergleich zwischen Quaddel - Typen F und F H
des Placebos der Versuchssubstanz R 2055

	n	SAQ	MAQ	Femp	p
Zwischen Patienten	3	1.114'50	371'50	32'45	0'1 %
Zwischen Zeiten	8	763'25	95'41	8'33	0'1 %
Zwischen Verfahren	1	1.984'50	1984'50	100'00	0'1 %
Patienten x Zeiten	24	667'75	27'82	2'43	5'0 %
Patienten x Verfahren	3	355'39	118'46	10'35	0'1 %
Zeiten x Verfahren	8	83'25	10'41	-	
Rest - Varianz	24	274'86	11'45		
Gesamt - Varianz	71	5.243'50	73'85		

Tabelle 13)

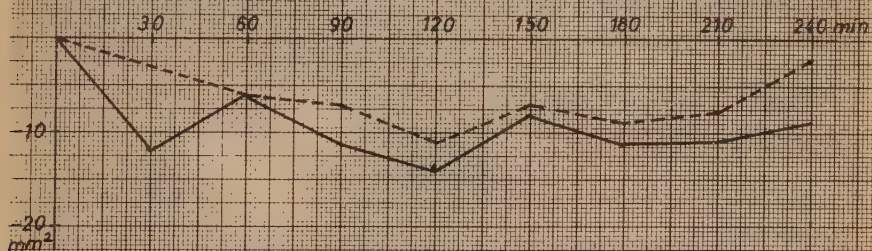
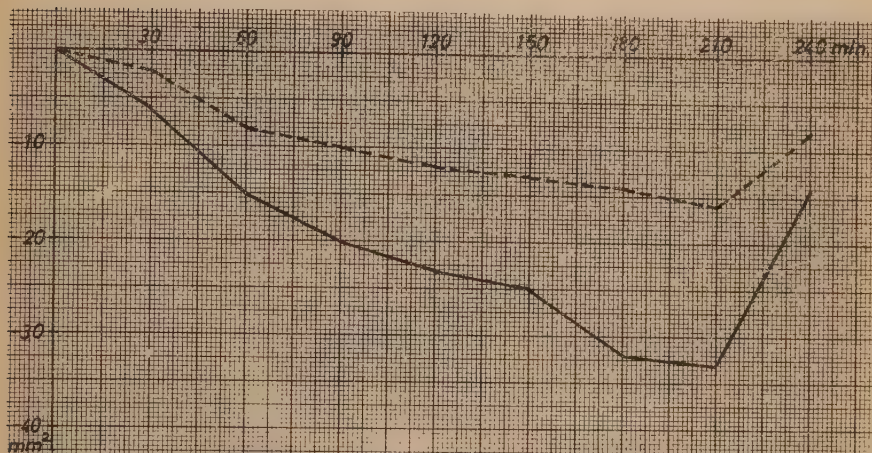
In den folgenden Abbildungen 3 und 4 sind die Mittelwertsdifferenzen der einzelnen "Verfahren" aufgetragen, die in den Tabellen 7 und 8, bzw. 11 und 12 aufgeführt sind.

In der Abbildung 3 sind die Mittelwertsdifferenzen der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddeln, in der Abbildung 4 die der reinen Farbstoff-Quaddeln eingezeichnet.



----- Versuchsreihe 1 : R 2055 (Werte aus Tab. 7/8)
 - - - - - Versuchsreihe 2 : Placebo (Werte aus Tab. 11/12)

Vergleich der Mittelwertsdifferenzen reiner Farbstoff-Quaddeln mit den zeitlich entsprechenden Mittelwertsdifferenzen der Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddeln.



———— Farbstoff + Hyaluronidase-Quaddel
 - - - - - reine Farbstoff-Quaddel

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Mathies H., Jankowski A. Klin.Wschr.35, 892 (1957)
- 2) Mathies H. Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)
- 3) Mathies H., Biechele D.,
Hartmann M. Ärzt.Forsch. 14, I/160 (1960)
- 4) Mathies H., v.Werther G. Arzneimittelforsch. 2, 576 (1959)
- 5) Mathies H. Zschr.ges.exper.Med. 131, 118 (1959)
- 6) Mathies H. Med.Mschr. 11, 791 (1957)
- 7) Mathies H. Zschr.Rheumaforsch. 18, 205 (1959)
- 8) Mathies H. Pharmazie 14, 429 (1959)
- 9) Mathies H. Med.Klin. 52, 1676 (1957)
- 10) Mathies H. Ärztl.Forsch. XII, I/87 (1958)
- 11) Mathies H., Glück A.,
Poulantzas J.,
Schmidt D. Med.Exp. 1, 64 (1959)
- 12) Scheufele R. Diss. München 1958
- 13) Mathies H., Schlierf G. in Vorbereitung
- 14) Gibian H. Erg.Enzymforsch. 13, 1 (1954)
- 15) Pantlitschko M.,
Kaiser E. Biochem.Zschr. 322, 137 (1951)
- 16) van Caneghem R.,
Marx R., Spier H.W. Arch.exp.Path.u.Pharm. 227, 149 (1955)
- 17) Mathies H. Verh.Dtsch.Ges.f.Inn.Med.65,Kongr.1959
- 18) Maxein H. Diss. München 1959
- 19) Ziwari P. Diss. München in Vorb.
- 20) Werres M. Diss. München 1960
- 21) Karlson P. Biochemie 1, 255 (1961)
- 22) Burk O. Diss. München 1962
- 23) Dettori A.G.,
Campanini W.,
Cucurachi L.,
Gelati M.,
Mastandrea R.,
Ponari O., Strata A. Ateneo parmense 32, 3 (1961)
- 24) Endele W. Diss, München 1961
- 25) Medinaveitia I. Biochemie 32, 1806 (1938)
- 26) Gibian H. Erg.d.Enzymforsch. 13, 1 (1954)
- 27) Jürgens J. Dt.med.Wschr. 84, 973 (1959)
- 28) Meder H. Diss. München 1961
- 29) Terhardt F. Diss. München 1961

Herrn Professor Dr. W. Seitz darf ich für die freundliche Überlassung der Arbeit danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Mathies danke ich vielmals für die Anweisung des Themas, für die wertvollen Anregungen und für die Ratschläge während der Versuche und während der Abfassung der Arbeit.

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse hat freundlicherweise Herr Dipl.-Math. K. Liebrich übernommen.

Der Firma J.R. Geigy A.G. Basel sei an dieser Stelle für die Überlassung der Versuchspräparate und die pharmakologischen Daten gedankt.

Lebenslauf

Am 12. Februar 1939 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Alfred Zinn und seiner Ehefrau Irma, geb. Platzer, in Regensburg a.d. Donau geboren.

Von 1945 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Weiden i.d. Oberpfalz und anschliessend die dortige Oberrealschule. Im Juli 1959 legte ich an der Maria-Theresia-Oberrealschule in München die Reifeprüfung ab und begann im Wintersemester 1959 / 60 das Studium der Medizin an der Universität München.

Hier bestand ich nach zwei Semestern die Naturwissenschaftliche Vorprüfung im Jahre 1960 und nach weiteren drei Semestern die Ärztliche Vorprüfung im Jahre 1962.

Im Sommer 1965 habe ich mit dem Staatsexamen nach elf Semestern das Studium der Medizin an der Universität München abgeschlossen.

